

2014 年度修士論文要旨

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における

PtSLC4-4 の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 松田研究室 岩山 和史

【研究目的】海水は光合成基質である CO_2 よりも HCO_3^- が豊富に存在する環境である。それに関わらず、海洋性珪藻類は効率良く光合成を行い、地球全体の CO_2 固定の約 20 %を担っている生物として近年注目されている。様々な生理学的研究の結果、 CO_2 だけでなく HCO_3^- も積極的に取り込み、光合成基質として利用している事がこれまでに示されているが、この分子機構の多くはまだ未解明である。我々の先行研究から、海洋性珪藻 *P. tricornutum* のゲノム上に 10 の無機炭素輸送体候補遺伝子が確認された。これらは哺乳類の solute carrier protein (SLC) に類似し、このうちの 3 遺伝子 (ptSLC4-1, ptSLC4-2, ptSLC4-4) が、大気レベル CO_2 (Low CO_2) 濃度環境下で顕著に転写誘導され 1% CO_2 (High CO_2) 濃度環境下で抑制されていた。この中の PtSLC4-2 は細胞膜に局在し、 Na^+ 依存的に HCO_3^- を輸送している事が明らかになった。一方、PtSLC4-1 及び PtSLC4-4 の機能同定はされていない。本研究では、 HCO_3^- 輸送体と考えられている PtSLC4-4 の機能を詳細に解析する事を目的とする。

【実験方法】先行研究によって作製された ptSLC4-4 の cDNA の直下に enhanced green fluorescence protein 遺伝子 (egfp) を連結させ、定常的プロモーターである fucoxanthin chlorophyll a/c binding protein 遺伝子 promoter (PfcpxA) で駆動するように設計したコンストラクトを、分子銃を用いて野生型 *P. tricornutum* に導入した。100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin を含む人工海水寒天培地上で一次選抜を行い、GFP 蛍光の有無による二次選抜を行った。得られた SLC4-4G 株 (TptSLC4-4::egfp) に関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いた GFP の局在解析、High CO_2 及び Low CO_2 環境生育時における酸素電極を用いた光合成パラメータの測定及び溶存無機炭素 (dissolved inorganic carbon : DIC) の取り込み活性測定、陰イオン輸送体の阻害剤である 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic Acid (DIDS) を添加する事による光合成パラメータ及び DIC の取り込み活性に与える影響を調べた。そして無機炭素の形態を 3 種類の pH によって変化させた環境で DIC 取り込み活性を測定する事によって輸送基質の同定を行った。次に、PtSLC4-4 のエフェクター分子を同定する為に、測定培地中から Na^+ を除き、DIC の取り込み活性を測定した。最後に、海洋性珪藻 *P. tricornutum* における細胞膜型輸送体の環境因子による使い分けのメカニズムを解明する為に、High CO_2 から Low CO_2 または $<0.002\%\text{CO}_2$ (Very Low CO_2) に順化させた時の発現量解析を定量的 RT-PCR (qRT-PCR)を用いて行った。

【実験結果と考察】PtSLC4-4::GFP 融合タンパク質の局在確認の結果、PtSLC4-4 は細胞膜に局在した。SLC4-4G 株は High CO_2 細胞において、 HCO_3^- に対する親和性、および DIC の取り込み活性が野生型と比較してそれぞれ約 1.9 倍、約 6.2 倍上昇した。また陰イオン輸送体の阻害剤である 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) を添加する事により濃度依存的に HCO_3^- に対する親和性が減少し、2.5mM DIDS で阻害効果が飽和した。High CO_2 生育 SLC4-4G 株では DIDS 阻害により親和性は High CO_2 生育野生型と同程度まで低下し、DIC の

取り込み活性は約 3.6 倍減少した。測定培地の pH 8.2 の時に High CO₂ 生育の SLC4-4G 株と野生型の DIC 取り込み活性に最も大きな差があった。次に、PtSLC4-4 のエフェクター分子同定実験の結果、測定培地中から Na⁺ を除いた時、DIC の取り込み活性はほぼ無くなり、再び Na⁺ を添加する事で、その活性は回復した。しかし、イオン選択にはある程度の寛容性がある事が示唆された。これらの結果、PtSLC4-4 が Na⁺ 依存性 HCO₃⁻ 輸送体である事を示した。最後に、CO₂ 濃度を変化させた時の輸送体の発現量解析の結果、3 つの SLC4 間で大きな変化が見られなかった。